

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 4 月 11 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462848

研究課題名(和文) 口腔癌増殖・浸潤を促進するRAGEの分子標的阻害薬の開発

研究課題名(英文) The development of targeted molecular therapy with RAGE on the Oral Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

太田 里永子(Ohta, Rieko)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫学部・研究員

研究者番号：30452460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がん患者のがん組織において、その82%に終末糖化産物受容体RAGEが発現している。RAGEは、HMGB1などをリガンドとし、種々の細胞内シグナルを介し、細胞増殖、細胞運動・浸潤、血管新生を促進する。一方、I型ムチンのMUC1は、多くのがん細胞に発現し、がん抗原として着目されている。本研究ではRAGE及びMUC1に対する2重抗体を作成する目的で、RAGEに対するモノクローナル抗体を作成し、2重単鎖抗体の作成及び結合性の改良を試みた。口腔がんのみならず、さまざまながんにもRAGE及びMUC1が発現していることから、これらの改良した抗体を用いることで、腫瘍の増殖抑制をもたらす可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Receptor for advanced glycation end products (RAGE) is expressed in 82% of oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients. RAGE promotes cell proliferation, migration, invasion, and angiogenesis of OSCCs through various intracellular signals induced by high mobility group box-1 (HMGB1) or the like as a ligand. On the other hand, type I mucin MUC1 is well known as a cancer antigen, highly overexpressed and loses its polarized distribution on the surface of tumor cells. In this study, we produced monoclonal antibodies against RAGE, then designed to improve the single chain Fv (bi-scFv) binding to both RAGE and MUC1. The bi-scFv binding to RAGE and MUC1 might suppress tumor growth and provide particular benefits under conditions of intractable cancers, since RAGE and MUC1 are expressed in various cancers and RAGE signaling is important for tumor growth.

研究分野：医歯薬学

キーワード：MUC1 口腔癌 抗体 腫瘍免疫

### 1. 研究開始当初の背景

口腔がん治療において形態及び機能の温存が、患者にとっての精神的及び身体的負担を大きく軽減するので、副作用が非常に少なく、奏効率の高い治療法の開発は急務である。

日本人の口腔がん患者のがん組織において、その 82% に終末糖化産物受容体 RAGE (receptor for advanced glycation end product) が発現している。RAGE は、HMGB1 (High Mobility Group Box-1) や終末糖化産物 AGE (Advanced glycation endproducts) などをリガンドとし、MAPK、Rac1 / Cdc42、NF- $\kappa$ B など種々の細胞内シグナルを介し、細胞増殖、細胞運動・浸潤、血管新生を促進する。

口腔がんのみならず、胃がん、大腸がん、食道がん、前立腺がんにおいても、RAGE と HMGB1 の発現ががんの進行・転移や再発・予後と相関することが報告されているため、がん細胞上の HMGB1-RAGE システムを阻止しようとする試みがなされている。現在、HMGB1 の吸着剤として、可溶性 RAGE (RAGE 細胞外ドメインの組み換え蛋白) や、HMGB1 の中和抗体 (抗 HMGB1 抗体) などが考えられている。しかし、これには欠点があり、HMGB1 を阻害すると、腫瘍免疫に必要な自然免疫を介した抗腫瘍活性も減弱させてしまうと予想される。また RAGE の阻害抗体 (抗 RAGE 抗体) も考えられているが、RAGE は正常組織にも低発現ではあるが広く分布しているため、未だ実用化に至っていない。

### 2. 研究の目的

口腔がんに特異的に過剰発現している粘液の主成分で高分子糖蛋白質ムチン MUC1 は、大腸がん、前立腺がん、乳がんなど多くのがんにおいてもその過剰発現が高頻度にみられる分子である。MUC1 の異常発現が腫瘍の増殖及び転移に寄与し、悪性度と強く相関していることから、がんの新たな分子標的治療薬の候補として注目を浴びている。

本研究では、抗 MUC1 抗体の抗原特異性を RAGE 機能中和抗体に付加させることで、口腔がん細胞に発現する RAGE の機能を特異的に阻害できると考えた。抗 MUC1 抗体の可変領域と、RAGE 機能中和抗体の可変領域を利用して、新規遺伝子組換え二重機能抗体を作製し、その機能を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) リコンビナント RAGE の作製

抗 RAGE モノクローナル抗体を作成するために、リコンビナント RAGE を作成した。はじめに、口腔がん細胞株 HSC4 より mRNA を抽出し、可溶性 RAGE (sRAGE) と膜型 RAGE (fRAGE) の cDNA をクローニングした。発現ベクターに組み込んだ後、CHO 細胞に遺伝子導入した。sRAGE 及び fRAGE の高発現細胞株を樹立した。

#### (2) 抗 RAGE モノクローナル抗体の作製

BALB/c マウスに sRAGE を 10 日毎に 2 回免疫し、その後、抗体価の上昇を確認後、脾臓細胞とミエロマ細胞と融合し、ハイブリドーマを作製した。96 穴プレートに撒き、sRAGE に対して反応性の強い抗体産生コロニーを数十個選んだ。

#### (3) 抗 MUC1 単鎖抗体の作製

MUC1 抗原に対する単鎖抗体を発現するベクターを CHO 細胞又は COS 細胞に導入して、抗 MUC1 単鎖抗体 (anti-MUC1 scFv) を作製した。CHO-MUC1 細胞を用いて、MUC1 に対する反応性をフローサイトメーター及び ELISA 方で検討した。また、Diabody 型及び、tandem scFv 型についても、発現ベクターを作製後、COS 細胞に遺伝子導入して、培養上清として単鎖抗体を得た。

#### (4) 作製した抗 RAGE モノクローナル抗体のがん細胞に対する反応性の検討

種々のがん細胞を用いて、作製した抗 RAGE モノクローナル抗体の反応性をフローサイトメーターにて解析した。

#### (5) 6A12 及び 3-47 の機能解析

がん細胞に、抗 RAGE 抗体を反応させ、その後、HMGB1 を加えた。ホルムアルデヒドで固定後、メタノール処理を行い、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) 抗体で染色した。フローサイトメーターにて解析を行い、RAGE の機能阻害効果を持つか検討した。

### 4. 研究成果

sRAGE は、N 末端に FLAG tag を付加して設計した。発現ベクターに組み込んだ後、CHO 細胞に遺伝子導入し、sRAGE の高発現株を取得した (図 1)。sRAGE をイオン交換カラムにて精製後、BALB/c マウスに投与し、ハイブリドーマを作成した。fRAGE を発現している CHO 細胞に反応性のよい 2 つのハイブリドーマについて、クローニングを行い、2 種のハイブリドーマを樹立した (図 2)。

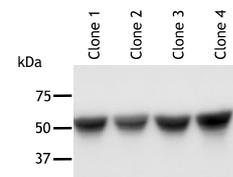


図 1 sRAGE 高発現 CHO 細胞の培養上清

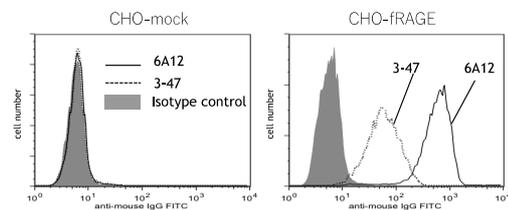


図 2 抗 RAGE モノクローナル抗体

次に、抗 MUC1 抗体の可変領域の単鎖抗体 (scFv) 作成を試みた。抗 MUC1 scFv 発現ベクターを CHO 細胞に導入し、培養上清を得た。

CHO-MUC1細胞を用いて、抗MUC1 scFv(一価)の反応性を確認したところ、野生型(二価)に比べて、反応性が著しく減弱することが確認できた(図3)。そこで、二価にするため、tandem型(tandem scFv)及びDiabody型(scDb)を設計した。それぞれの発現ベクターを構築後、CHO細胞に遺伝子導入し、培養上清を得た。二価型にすることで、抗MUC1抗体の可変領域の反応性に改善が認められた(図3)。

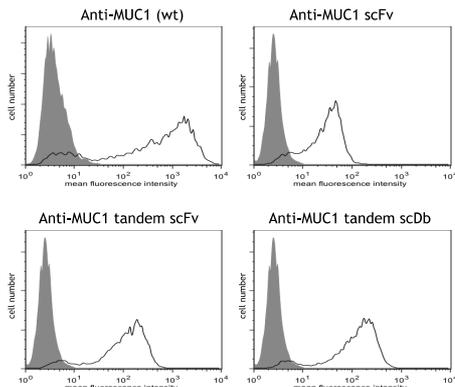


図3 抗MUC1単鎖抗体の作成

次に、種々の腫瘍細胞を用いて、RAGE及びMUC1の発現と反応性を検討した。口腔がん細胞(HO-1-U-1, HSC4)のみならず、乳癌細胞株(MDA-MB-468, T-47D)、胃癌細胞株(MKN45, MKN28)でもMUC1の高発現と、RAGEの発現が認められた(図4)。

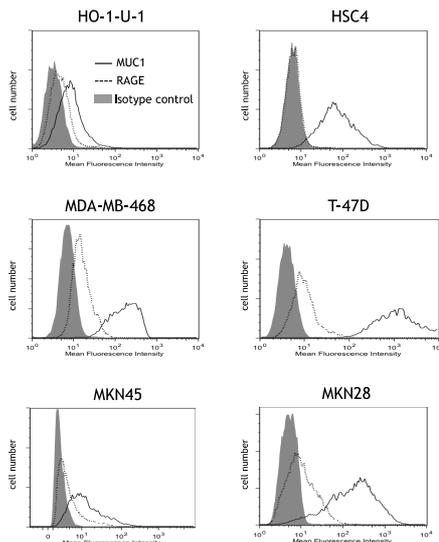


図4 種々のがん細胞上のMUC1及びRAGEの発現

多くのがん細胞で、HMGB1やその他の増殖因子を自ら産生し、オートクリン的にRAGEなどの自らの細胞表面に発現している受容体に作用させ、増殖する。そこで、今回作成した抗RAGE抗体が、RAGEを介した細胞増殖に阻害効果を持つかどうかを検討した。がん細胞を始めに、抗RAGE抗体で処理を行い、その後HMGBを加え、Erk1/2のリン酸化を抑えることができるかどうか、フローサイトメーターで検出した。解析の結果、今回作成し

た抗体で、RAGEを阻害する傾向が確認できた(図5)。

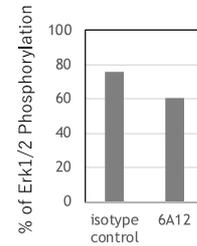


図5 RAGE機能阻害効果

今回我々の結果は、RAGE及びMUC1を発現しているがん細胞において、抗体療法の腫瘍の増殖抑制をもたらす可能性を示した。特に、RAGEについては、さまざまな

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(学会発表)(計 14件)

太田里永子, 葛島清隆, 藤田禎三, 岡田秀親, 今井優樹. 補体活性化による腫瘍の分子標的治療薬の開発. 第54回補体学会学術集会 2017年9月1日~2日 コラッセ福島(京福島市) Ohta R, Imai M, Kuwahara K, Fujita T, Okada H, Kuzushima K. 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月5日~6日 第45回日本免疫学会学術集会 沖縄コンベンションセンター(宜野湾市) Imai M, Odanaka M, Takayama S, Ohta R, Yamazaki S. C5adesArg still induce the acute inflammatory response. The Cold Spring Harbor Asia conference on Frontiers of Immunology in Health & Disease 2016年10月3日~6日 淡路夢舞台国際会議場(淡路市) Imai M, Odanaka M, Takayama S, Ohta R, Yamazaki S. C5adesArg still induce the acute inflammatory response. The XXVI International Complement Workshop 2016年9月4日~8日 ホテル日航金沢(金沢市) 河村剛至, 太田里永子, 山本博之, 今井優樹, 松浦凌太, 松山悟, 佐古兼一, 羽二生久夫, 岡田秀親, 松田佳和. 好中球エラストアーゼによる新規カルボキシペプチダーゼRの生成. 日本薬学会第136年会 2016年3月26日~29日 パシフィコ横浜(横浜市) Takayama S, Odanaka M, Ohta R, Imai M, Yamazaki S. Differential roles of complement anaphylatoxin C5a and C5adesArg. 第44回日本免疫学会学術集会 2015年11月18日~20日 札幌コンベンションセンター(札幌市) Tsujimura K, Ohta R, Imai M, Yamazaki S. Analysis of C5a receptor expression on the various subsets of

dendritic cells. LC2015 14th International Workshop on Langerhans Cells 2015年11月5日～8日 kyoto internationa community house(京都市)  
辻村幸平, 太田里永子, 今井優樹, 山崎小百合. C5a第2レセプターC5L2の発現解析. 第52回日本補体学会学術集会 2015年8月21日～22日 名古屋大学医学部附属病院中央診療棟3階講堂(名古屋市)  
河村剛至, 太田里永子, 今井優樹, 大澤真以, 塩見友祐, 羽二生久夫, 岡田秀親, 岡田則子, 松田佳和. 好中球エラスターゼにより活性化する新規カルボキシペプチダーゼ R の解析. 第52回日本補体学会学術集会 2015年8月21日～22日 名古屋大学医学部附属病院中央診療棟3階講堂(名古屋市)  
河村剛至, 太田里永子, 今井優樹, 大澤真以, 今井由美, 羽二生久夫, 松田佳和. 線溶抑制を起こさずに炎症を抑制する変異型 proCPR 作製の試み. 日本薬学会大135年会 2015年3月25日～28日 神戸学院大学他(神戸市)  
Ohta R, Imai M. The production of a recombinant bispecific monoclonal antibody against both the complement inhibitor CD59 and the tumor-associated antigen MUC1. 第43回日本免疫学会学術集会 2014年12月10日～12日 国立京都国際会館(京都市)  
河村剛至, 大澤真以, 今井由美, 松田佳和, 太田里永子, 今井優樹, 羽二生久夫, 岡田則子, 岡田秀親. 好中球エラスターゼによるプロカルボキシペプチダーゼ R 活性化機構の解析. 第51回補体シンポジウム 2014年8月22日～23日 神戸常盤大学4号館(神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 里永子 (OHTA RIEKO)  
愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫学  
学部・研究員  
研究者番号: 30452460

### (2) 研究分担者

今井 優樹 (IMAI MASAKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 30440936